昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, September 2017, 60(9): 994 – 1005 doi:10.16380/j.kcxb.2017.09.003

# 梨小食心虫几丁质合成酶 1 基因的克隆与表达分析

杨 静[1], 高 越[1], 刘中芳[1], 张鹏九[1], 樊建斌[1], 牛国飞[1], 韩召军[2], 范仁俊[1,*]

(1. 山西省农业科学院植物保护研究所, 农业有害生物综合治理山西省重点实验室, 太原 030031;
2. 南京农业大学植物保护学院, 农作物生物灾害综合治理教育部重点实验室, 南京 210095)

**摘要:**【目的】克隆梨小食心虫 *Grapholitha molesta* (Busck) 几丁质合成酶 1 基因, 分析该基因的分子特征及时空表达模式, 为探析其生理功能奠定基础。【方法】利用简并引物和 RACE 技术从梨小食心虫 5 龄幼虫和蛹中克隆几丁质合成酶 1 基因的全长 cDNA 序列, 同时获得其两个可变剪切外显子序列, 并用邻接法(neighbor-joining method)与其他昆虫同源序列构建系统进化树。利用 RT-qPCR 技术研究该基因及两个可变剪切外显子在 1 日龄预蛹不同组织(头、体壁、脂肪体、中肠、气管和马氏管)中以及不同发育阶段(2 – 5 龄幼虫、预蛹、蛹和成虫)的表达特性。【结果】克隆获得梨小食心虫几丁质合成酶 1 基因, 将其命名为 *GmCHS*1, 该基因编码 1 565 个氨基酸, 包含了 16 个跨膜螺旋, 两个可变剪切外显子包含 177 个碱基, 编码 59 个氨基酸序列, 分别命名为 *GmCHS1a* (GenBank 登录号: MF000781) 和 *GmCHS1b* (GenBank 登录号: MF000782)。系统发育树同源分析结果表明, GmCHS1 属于几丁质合成酶 1, GmCHS1a 和 GmCHS1b 分别归属于可变剪切外显子 CHS1a 和 CHS1b。组织表达模式表明, *GmCHS*1 基因在体壁中表达量最高, 其次是在头和气管中, 其余组织中表达量较低或不表达; 发育表达模式表明, 该基因在各个发育阶段均有表达, 幼虫蜕皮期、预蛹-蛹和蛹-成虫转变过程中表达量上调。*GmCHS1a* 在体壁和头部的表达量高于 *GmCHS1b*, 而在气管和脂肪体中的表达量略低于 *GmCHS1b*, 两者在中肠和马氏管中表达量都很低。在梨小食心虫不同发育阶段, *GmCHS1a* 的表达趋势表现为在幼虫蜕皮和预蛹-蛹转变过程中高表达; *GmCHS1b* 在幼虫各个阶段表达量都较低, 在预蛹-蛹和蛹-成虫转变过程中高表达。【结论】GmCHS1a 和 GmCHS1b 属于昆虫几丁质合成酶 1 家族, 其基因在梨小食心虫不同组织及发育阶段的表达量显著不同, 推测其在梨小食心虫发育过程中发挥着不同的作用。本研究为进一步探索该基因在梨小食心虫体内的功能奠定了基础。

**关键词:** 梨小食心虫; 几丁质合成酶; 表达谱; RT-qPCR; 可变剪切外显子

**中图分类号:** Q966　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2017)09-0994-12

# Cloning and expression profiling of chitin synthase 1 gene in the oriental fruit moth, *Grapholitha molesta* (Lepidoptera: Tortricidae)

YANG Jing[1], GAO Yue[1], LIU Zhong-Fang[1], ZHANG Peng-Jiu[1], FAN Jian-Bin[1], NIU Guo-Fei[1], HAN Zhao-Jun[2], FAN Ren-Jun[1,*] (1. Key Laboratory of Integrated Pest Management in Agriculture (IPMA), Institute of Plant Protection, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China; 2. Key Laboratory of Integrated Management Crop Diseases and Pests, Ministry of Education, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:**【Aim】To clone a chitin synthase 1 gene from the oriental fruit moth, *Grapholitha molesta* (Busck) and to analyze its mRNA molecular characteristics and spatio-temporal expression patterns, so

基金项目: 山西省农业科学院博士研究基金(YBSJJ1513); 山西省青年基金(2015021147); 山西省重点研发计划(201603D21110-2); 山西省科技重点研发项目(2015-TN-03-09)

作者简介: 杨静, 女, 1983 年 11 月出生, 山西临汾人, 博士, 助理研究员, 研究方向为昆虫分子生物学, E-mail: jingyang830317@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: rjfan@163.com

收稿日期 Received: 2017-05-22; 接受日期 Accepted: 2017-08-10

as to develop a basis for further research of the biological function of this gene.【Methods】The complete cDNA of a chitin synthase 1 gene was cloned from the 5th instar larvae and pupae of *G. molesta* by using degenerate primers and RACE technology, and two alternative splicing exons were obtained. Phylogenetic trees were constructed with the homologous sequences of other insects by using neighbor-joining method. The expression patterns of this gene in different tissues of 1 day-old prepupae (head, integument, fat body, midgut, trachea and Malpighian tubules) and different developmental stages (2nd – 5th instar larva, prepupa, pupa and adult) were detected by RT-qPCR.【Results】The full-length cDNA of a chitin synthase 1 gene was cloned from *G. molesta*, and named *GmCHS*1. It encodes 1 565 amino acids, and contains 16 transmembrane helices. The two alternative splicing exons are located in the region consisting of 177 nucleotides that encodes 59 amino acid residues, and named *GmCHS1a* (GenBank accession no.: MF000781) and *GmCHS1b* (GenBank accession no.: MF000782), respectively. The phylogenetic trees showed that GmCHS1 belongs to the chitin synthase 1 family, and the two alternative exons of GmCHS1a and GmCHS1b are grouped into the corresponding two classes, CHS1a and CHS1b. The tissue expression profiles of *GmCHS*1 indicated that it had the highest expression level in the integument, followed by trachea and head, while had a low expression level or was hardly expressed in other tissues. The developmental expression profiles of *GmCHS*1 showed that it was expressed throughout the whole developmental stages, and showed high expression during larval-larval molting, prepupal-pupal and pupal-adult transformation. The expression levels of *GmCHS1a* were higher in the integument and head but slightly lower in trachea and fat body than those of *GmCHS1b*. During growth and development of *G. molesta*, *GmCHS1a* was mainly expressed during larval-larval molting and prepupal-pupal transformation, while *GmCHS1b* was expressed during the prepupal-pupal and pupal-adult transformation.【Conclusion】GmCHS1a and GmCHS1b should be classified into chitin synthase 1 family. The expression levels of *GmCHS1a* and *GmCHS1b* are significantly different in different tissues and developmental stages of *G. molesta*, suggesting that these two genes play different roles in the growth and development of *G. molesta*. This study lays the foundation for the further research of the function of *GmCHS1a* and *GmCHS1b* in *G. molesta*.

**Key words**: *Grapholitha molesta*; chitin synthase; expression profile; RT-qPCR; alternative exons

梨小食心虫 *Grapholitha molesta* (Busck)是世界性的主要蛀果害虫之一(Kirk *et al*., 2013)。在我国,除西藏未见报道外,在各梨、桃产区均有发生,尤以东北、华北、华东地区发生普遍(Wei *et al*., 2015)。梨小食心虫个体较小,具有蛀梢、蛀果的习性,年繁殖代数多、世代重叠,预测预报较困难,给防治带来一定的难度。因此,长期以来,梨小食心虫的研究一直受到广泛重视(范仁俊等, 2013; Zheng *et al*., 2013, 2015; Yang *et al*., 2016)。

几丁质(chitin)是自然界含量最丰富的氨基多糖,主要存在于无脊椎动物、藻类、真菌等生物体中(Andersen *et al*., 1995; Arakane *et al*., 2004)。在昆虫中,几丁质是表皮的主要成分,除头壳和躯体的外骨骼以外,还是气管内膜及中肠上皮细胞形成的围食膜的重要结构成分,起到了保护、支持、营养的作用(Kramer and Koga, 1986; Khajuria *et al*., 2010; Zhang *et al*., 2010)。昆虫生长与变态发育过程中,其表皮与围食膜不断地脱落和再生,几丁质也被不断地重复合成和降解(Merzendorfer and Zimoch, 2004)。

几丁质合成酶(chitin synthase, CHS)是昆虫几丁质代谢过程中的关键酶,在昆虫生长发育过程中扮演着重要的角色(Candy and Kilby, 1962)。昆虫几丁质合成酶的分子量超过 170 kD,是一种大型跨膜蛋白(张文庆等, 2011)。目前,在昆虫中发现的几丁质合成酶可以分为两类,CHS1 和 CHS2 (Nagahashi *et al*., 1995; 陆建良等, 2008; Zhang *et al*., 2010; 张文庆等, 2011; Qu and Yang, 2012)。CHS1 主要在体壁、气管等外胚层细胞中表达,在卵、幼虫蜕皮过程及成蛹过程和蛹的发育过程负责表皮、气管等组织的几丁质合成;而 CHS2 主要在肠壁细胞中表达,其表达产物参与围食膜的形成(Zimoch and Merzendorfer, 2002)。几丁质合成酶 1 含有可变剪切外显子,长度为 177 bp,编码 59 个氨基酸,这两个可变剪切外显子含有很高的相似性,可能是由基因复制产生的(Gagou *et al*., 2002; Arakane

*et al*., 2004; Hogenkamp *et al*., 2005; Merzendorfer, 2006; Ashfaq *et al*., 2007; Chen *et al*., 2007; Zhang *et al*., 2010)。

几丁质合成酶是无脊椎动物体内特有的基因,因此是潜在的环境友好杀虫剂以及专一性基因干扰防控技术的理想靶标。目前尚未有关于梨小食心虫几丁质合成酶的分子克隆及功能研究的报道。本研究利用简并引物及 RACE 技术成功克隆了梨小食心虫 *CHS*1 基因(*GmCHS*1)的 cDNA 全长序列及其两个可变剪切外显子序列(*GmCHS1a* 和 *GmCHS1b*),并利用相关软件分析了该基因的序列特征,通过 RT-qPCR 技术阐明了该基因的时空表达模式,为进一步研究梨小食心虫几丁质合成酶基因功能奠定基础,也为以几丁质合成酶为靶标的新型杀虫剂以及基因干扰技术的研究开发提供理论依据,为梨小食心虫的高选择性防治提供新的思路和方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

供试梨小食心虫最初采自山西省太谷县桃园桃稍,随后幼虫在室内人工气候箱用人工饲料饲喂(王艳蓉等, 2011),在 26±0.5℃、相对湿度 70%±10%、光周期 15L∶9D 条件下饲养,成虫饲喂 5% 蜂蜜水。分别取不同龄期的试虫及预蛹第 1 天试虫的不同组织,并用液氮迅速冷冻,置于 -80℃保藏待用。

### 1.2 主要试剂和仪器设备

RNAeasy Mini Kits 为德国 Qiagen 公司产品;5′ RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends Version 2.0 为美国 Invitrogen 公司产品;Prime Script Ⅱ 1st Strand cDNA Synthase, Ex Taq, LA Taq, 3′-Full RACE Core Kit 和 SYBR Premix Ex Taq Ⅱ (TliRNaseH$^+$)为宝生物工程大连有限公司(TAKARA)产品;Gel Extraction 和 Plasmid Mini Kit Ⅰ为 Omega 公司产品;pEASY-T1 Cloning kit 和 Trans1-T1 Phage Resistant 感受态细胞为北京全式基因产品;PCR 引物合成由上海 Invitrogen 公司合成;普通测序工作由北京美吉生物科技有限公司完成。

凝胶成像系统 AlphaImager HP 由美国 Protein Simple 公司生产;T100 热循环仪由美国 Bio Rad 公司生产;LineGene 9600 荧光定量 PCR 仪由杭州博日科技有限公司生产。

### 1.3 梨小食心虫几丁质合成酶 1 基因的克隆

取梨小食心虫 5 龄幼虫和蛹各 1 头,利用 Qiagen 公司的总 RNA 提取试剂 RNAeasy Mini Kits 提取总 RNA,将幼虫和蛹的总 RNA 混合,使用 TAKARA 公司的 PrimeScript Ⅱ 1st Strand cDNA Synthase 合成 cDNA 第 1 链,作为聚合酶链式反应(PCR)的模板。利用简并引物(林晨, 2010)(F1-F, F1-R, F2-F, F2-R, F3-F, F3-R, F4-F, F4-R, F5-F 和 F5-R, 表 1)扩增梨小食心虫几丁质合成酶 1 基因的中间片段,PCR 反应体系按照试剂说明书;PCR 反应条件: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s,温度梯度 45-60℃退火 1 min, 72℃ 30 s, 35 个循环;72℃ 10 min。5′ RACE 反应按照 5′ RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends Version 2.0 试剂盒说明书进行,3′RACE 反应按照 3′-Full RACE Core Kit 试剂盒说明书进行。

获得的 PCR 反应产物使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,将目的条带按照 Gel Extraction 试剂盒说明书进行纯化回收,回收后的 PCR 产物连接到载体 pEASY-T1 上,转化进入 Trans1-T1 Phage Resistant 感受态细胞中,进行蓝白斑筛选,挑选阳性克隆送到公司进行测序。

通过 5′和 3′ RACE 获得的序列及中间序列比对拼接获得目的基因全长 cDNA 序列,在该基因的 5′和 3′非编码区设计引物(表 1),通过 PCR 进行 end-to-end 扩增并测序,用于验证拼接的基因序列是否正确。

### 1.4 梨小食心虫几丁质合成酶 1 基因序列生物信息学分析

利用 NCBI 中的 ORF Finder 确定其完整编码序列并显示其编码的氨基酸序列;利用 NCBI 的 BLASTP 进行蛋白同源性比较分析;利用 ProtPar 软件(http://web.expasy.org/protparam/)预测蛋白的理论分子量和等电点等;利用 TMHMM 软件(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)对蛋白的跨膜区进行分析;利用 NetNGlyc1.0 软件(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/)分析信号肽和糖基化位点;保守结构域也通过 NCBI BLSAT 查找分析;利于 Cluster X 将梨小食心虫几丁质合成酶 1 基因推测的氨基酸序列与 GenBank 数据库中登录的其他昆虫的几丁质合成酶氨基酸序列进行比对;利用 MEGA5.0 软件邻位相接法(neighbor joining, NJ)构建系统发育树,重复数 1 000。

### 1.5 梨小食心虫几丁质合成酶 1 基因时空表达分析

根据王芳等(2016)对梨小食心虫龄数和龄期

**表 1　本研究所用的引物**

**Table 1　Primers used in this study**

| 引物 Primers | 引物序列(5′-3′) Primer sequences | 引物用途 Use of primers |
| --- | --- | --- |
| F1-F | CAARYHACBGSNTTYDTYGTNTGG | *GmCHS*1 cDNA 扩增 Amplification of *GmCHS*1 cDNA |
| F1-R | GTCARARAACWNATCATYTC | |
| F2-F | GTCGCYTTTTGCAGCCARTG | |
| F2-R | GTCGCYTTTTGCAGCCARTG | |
| F3-F | GTCDCARGTNATGTACATG | |
| F3-R | ARATSARGARCADRTACA | |
| F4-F | ACTATATTCCTTATGTTGGTG | |
| F4-R | CTCAAAAGTCWACTTCRCCC | |
| F5-F | GGGYGAAGTWGACTTTTTGAG | |
| F5-R | TGTGCCTATRTKCCTCTTCTTC | |
| GSP1 | CGGGATGACTAGATTGATAGGAAACGCA | 5′ RACE |
| GSP2 | AAACTTTTGATTATACCAATGGGGCTCTGT | |
| nested GSP | GTCTTGTTACGTAGTTCTCCACCATCCCA | |
| Out Primer | ATCGGTCTGGTGTTCGTGTT | 3′ RACE |
| Inner Primer | TCGCATATCTTGGCATCCAC | |
| CHS1-F | CACCCAATAAGAGTCGTGAACC | *GmCHS*1 全长 cDNA 扩增 |
| CHS1-R | TATTTAGCGACTTTCCTGTTCC | Amplification of the full length cDNA of *GmCHS*1 |
| CHS1-qPCR-F | CGCAATACTAGGTCTGCTGTCA | *GmCHS*1 RT-qPCR |
| CHS1-qPCR-R | ATACCAATGGGGCTCTGTCTT | |
| HS1a-qPCR-F | TGTCCTCATTGTGTTCTTATTGC | *GmCHS1a* RT-qPCR |
| CHS1a-qPCR-R | ACCTCTTGCGTAACCTCATC | |
| CHS1b-qPCR-F | AACTCAACAAAGATCAACTCCAC | *GmCHS1b* RT-qPCR |
| CHS1b-qPCR-F | AAGAACACGAACACCAGACC | |
| Actin-F | AGAGGGAAATCGTGCGTGA | 内参基因扩增 |
| Actin-R | CATACCCAGGAAGGAAGGCT | Amplification of internal reference gene |

的划分标准，分别取 2-5 龄前期、中期和后期幼虫，第 1 和 3 天预蛹，第 1，3，5 和 7 天蛹以及第 1 和 3 天成虫试虫，提取总 RNA，反转录获得 cDNA 第 1 链，不同龄期的样品均重复 3 次。取第 1 天预蛹试虫的头、体壁、脂肪体、中肠、气管和马氏管提取总 RNA，反转录获得 cDNA 第 1 链，每个组织重复 3 次。设计 RT-qPCR 引物（表 1）用于检测梨小食心虫几丁质合成酶 1 基因时空表达模式。将反转录合成的梨小食心虫不同发育阶段和不同组织的 cDNA 模板稀释 20 倍，根据试剂盒说明书，RT-qPCR 反应体系：cDNA 模板 2 μL，SYBR Premix Ex Taq Ⅱ（2×）10 μL，上下游引物（10 μmol/L）分别为 0.8 μL，ROX Reference Dye Ⅱ（50×）0.4 μL，$ddH_2O$ 6 μL，总反应体系为 20 μL。反应程序：95℃预变性 30 s；95℃变性 5 s，60℃退火及延伸 34 s，45 个循环。每个样本进行 3 个技术重复，不同龄期的表达量以目的基因在 2 龄幼虫中的表达量作为 1，不同组织的表达量以目的基因在马氏管中的表达量作为 1。随后利用 Primer Premier 5.0 软件在可变剪切外显子部位设计特异引物（表 1），RT-qPCR 检测目标基因表达量的变化，RT-qPCR 反应体系和反应条件同上，不同龄期的表达量以其中一个目的基因在 2 龄幼虫的表达量作为 1，不同组织的表达量以该基因在马氏管的表达量作为 1。以 *Actin* 为内参基因（GenBank 登录号：KF022227），被测目标基因表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。表达量的差异显著性比较采用 SPSS 软件中的单因素方差分析（ANOVA，Tukey 氏多重比较法，$P<0.05$）进行。

## 2 结果

### 2.1 梨小食心虫几丁质合成酶 1 基因的克隆及蛋白特性

在 NCBI 搜索其他昆虫的几丁质合成酶 1 序列，根据这些序列的保守区设计简并引物，扩增了梨小食心虫 *CHS*1 基因的 5 个片段，拼接后获得了该基因3 563 bp的中间片段。利用 RACE 技术扩增分别得到了该基因的5′端和3′端序列。将3 部分序列拼接得到了梨小食心虫 *CHS*1 基因的全长 cDNA 序列。而后分别在 5′和 3′非编码区设计引物进行 end-to-end 扩增获得 *CHS*1 的 cDNA 序列，用于验证拼接的序列是否正确。测序后通过序列对比确认该序列为梨小食心虫 *CHS*1 基因，命名为 *GmCHS*1。同时，发现 *GmCHS*1 存在两个可变剪切外显子序列，分别命名为 *GmCHS1a* (GenBank 登录号: MF000781) 和 *GmCHS1b* (GenBank 登录号: MF000782)。

*GmCHS*1 全长为 5 222 bp，开放阅读框为 4 698 bp，其中 5′端非编码区长 160 bp，3′端非编码区长 364 bp，共编码 1 565 个氨基酸(图 1)，*GmCHS1a* 和 *GmCHS1b* 在 3 929 – 4 105 bp 之间存在 177 bp 的差异，编码 59 个氨基酸，氨基酸序列一致性高达70%(图1 加粗字母和图2)。通过软件预测分析，*GmCHS1a* 基因编码蛋白的分子量为 178.73 kD，理论等电点为 6.43，包含了 186 个带负电荷的氨基酸(Asp 和 Glu)，以及 176 个带正电荷的氨基酸(Arg 和 Lys)；氨基酸序列不含有信号肽，有 7 个预测 N-糖基化位点(图 1 方框)；包含了 16 个跨膜螺旋区(图 1 灰色背景)；其中 322 个氨基酸是几丁质合成酶的保守序列(图 1 下划线)，包含了几丁质合成酶特有的标签序列 EDR 和 QRRRW(图 1 黑色背景)。*GmCHS1b* 基因编码蛋白的分子量为 178.46 kD，理论等电点为 6.43，包含 184 个带负电荷的氨基酸(Asp 和 Glu)，以及 174 个带正电荷的氨基酸(Arg 和 Lys)，其余结构特征与 *GmCHS1a* 基因编码蛋白相同。

### 2.2 GmCHS1 的系统发育

利用 NCBI 的 BLASTP 进行蛋白相似性比较分析发现，*GmCHS1a* 和 *GmCHS1b* 基因推导的氨基酸序列与其他物种同源基因编码的 CHS1 蛋白氨基酸序列一致性达到 65% 以上，与云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana*，棉铃虫 *Helicoverpa armigera*，柑橘凤蝶 *Papilio xuthus*，亚洲玉米螟 *Ostrinia fumacalis*，小菜蛾 *Plutella xylostella*，家蚕 *Bombyx mori*，烟草天蛾 *Manduca sexta*，马铃薯块茎蛾 *Phthorimaea operculella* 和茶尺蠖 *Ectropis obliqua* 等昆虫 CHS1 的氨基酸序列一致性达到 88% 以上，与冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*，赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* CHS1 的氨基酸序列一致性分别为 74%，71% 和 70%。将 GmCHS1a 和 GmCHS1b 与其他昆虫 CHS 的氨基酸序列进行比对，并构建分子系统进化树，从图 3 (A)可以看出 CHS 分为两类，即 CHS1 和 CHS2。GmCHS1a 和 GmCHS1b 与其他昆虫的 CHS1 聚为一个大支，表明我们获得的 *GmCHS1a* 和 *GmCHS1b* 基因属于昆虫的几丁质合成酶 1 基因家族。利用相同的方法对两个可变剪切外显子的氨基酸序列进行分析，GmCHS1a 和其他昆虫 CHS1a 外显子聚为一支，GmCHS1b 则与其他昆虫 CHS1b 外显子聚为一支(图 3：B)。

### 2.3 *GmCHS*1 基因在梨小食心虫不同组织中和不同发育阶段的表达特性

利用 RT-qPCR 技术对几丁质合成酶 1 基因在梨小食心虫不同组织的表达进行了分析(图4)。结果显示，*GmCHS*1 在梨小食心虫不同组织的表达量有很大的差异。在躯干体壁中的表达量最高，在头和气管中也有较高的表达，在脂肪体、中肠和马氏管中有少量的表达。

*GmCHS*1 在梨小食心虫不同发育阶段的表达分析结果表明(图 5)，*GmCHS*1 在梨小食心虫幼虫、预蛹、蛹和成虫的不同发育阶段均有表达，但是表达量存在一定的差异。在幼虫各个阶段和预蛹期 *GmCHS*1 的相对表达量随着蜕皮的发生而表现出周期性的升降，在 3 – 5 龄幼虫和预蛹前期和中期表达量低，而在后期表达量显著升高，均为各个阶段的表达量最高值；1 日龄蛹期 *GmCHS*1 表达量达到整个发育阶段的最高峰，为 2 龄幼虫中的 20 倍，在 3 日龄蛹中 *GmCHS*1 表达量急剧下降，随后，该基因的表达量先上升后逐渐下降。*GmCHS*1 在不同发育阶段的总体表达趋势为在幼虫蜕皮期、预蛹-蛹及蛹-成虫转变过程中高表达，其余发育阶段表达量变化不大。

进一步对几丁质合成酶 1 基因的两个可变外显子的表达量进行分析表明，*GmCHS1a* 在躯干体壁和头部中的表达量高于 *GmCHS1b*，而在气管和脂肪体中的表达量略低于 *GmCHS1b*；两者在中肠和马氏管中表达量都很低(图 6：A，B)。

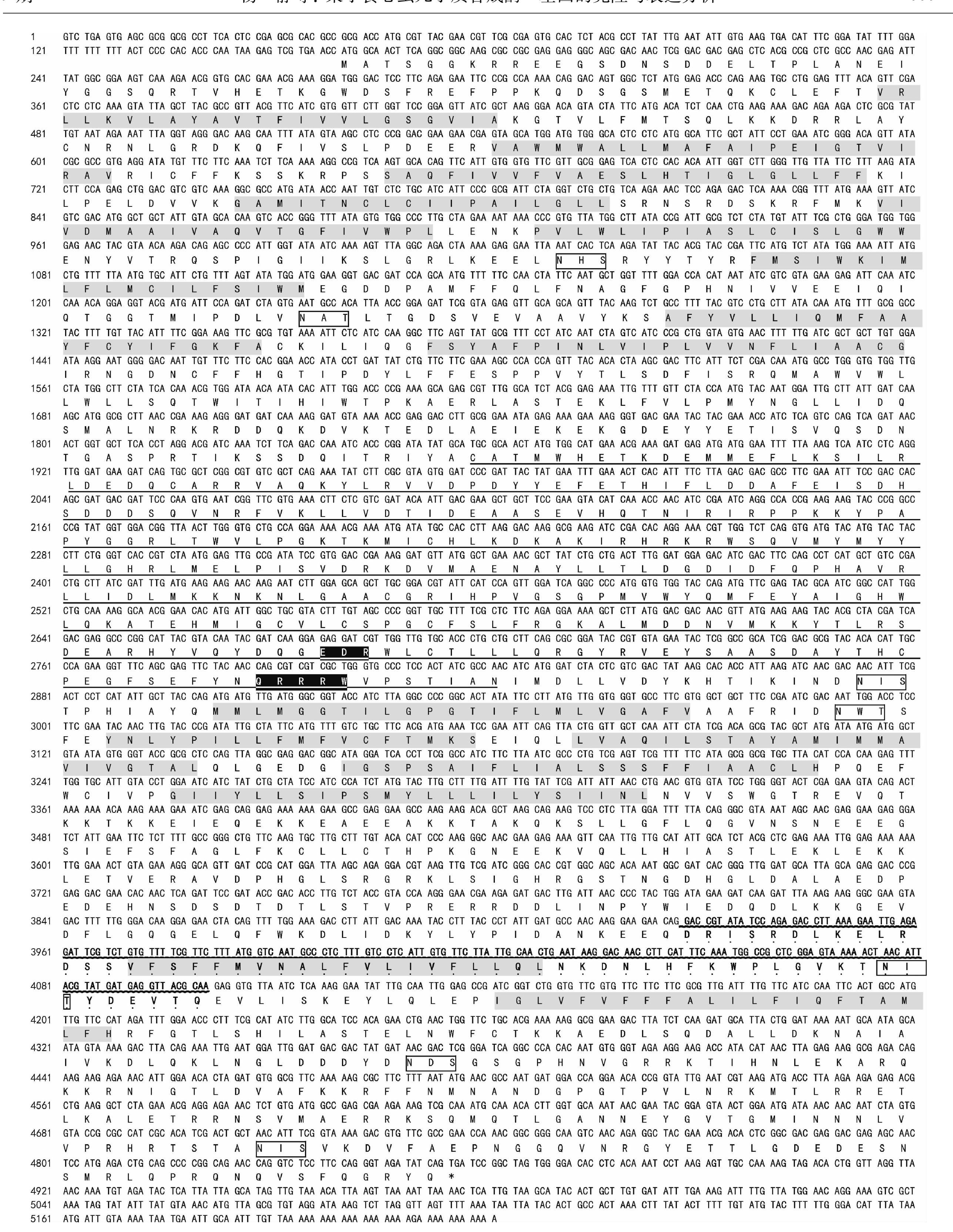


图 1　梨小食心虫 *GmCHS* 1 cDNA 序列和推导的氨基酸序列

Fig. 1　cDNA and deduced amino acid sequences of *GmCHS* 1 from *Grapholitha molesta*

灰色背景表示跨膜螺旋区，下划线表示几丁质合成酶保守序列，黑色背景表示几丁质合成酶基因的 2 个标签序列 EDR 和 QRRRW，方框表示预测的 N-糖基化位点，加粗字母为可变剪切位点。Gray color indicates trans-membrane helices, the amino acids underlined denote conserved motif of CHS1, black color indicates two signature motifs EDR and QRRRW of CHS, the amino acids in frames indicate potential N-glycosylation sites, and the letters in bold indicate alternative splicing region.

```
A
GmCHS1a    GACCGTATATCCAGAGACCTTAAAGAATTGAGAGATTCGTCTGTGTTTTC    50
GmCHS1b    GCTCGCATTGCTGCCGATTTGATAGAGCTTCGTAATAAATCAGTTTTTGC    50
           *  ** **  *    **  * * ***  *  *  **   ** ** *** *
GmCHS1a    GTTCTTTATGGTCAATGCCCTCTTTGTCCTCATTGTGTTCTTATTGCAAC   100
GmCHS1b    ATTCGTTATGTTTAACGCGTTATTCATATTAATAGTGTTTTTGTTACAAC   100
            *** ***** * ** **  * **  *  * ** ***** ** ** ****
GmCHS1a    TGAATAAGGACAACCTTCATTTCAAATGGCCGCTCGGAGTAAAAACTAAC   150
GmCHS1b    TCAACAAAGATCAACTCCACGTGGATTGGCCTTTAGGAATTAAGACAAAT   150
           * ** ** **  * ** **  *  * *****  * *** * ** ** **
GmCHS1a    ATTACGTATGATGAGGTTACGCAAGAG                          177
GmCHS1a    ATTACGTACATCGGGGAGACAGGCGAG                          177
           ********   * **  **   ***

B
GmCHS1a    DRISRDLKELRDSSVFSFFMVNALFVLIVFLLQLNKDNLHFKWPLGVKTN    50
GmCHS1b    ARIAADLIELRNKSVFAFVMFNALFILIVFLLQLNKDQLHVDWPLGIKTN    50
            **  ** ***  *** * * **** *********** **  **** ***
GmCHS1a    ITYDEVTQE                                             59
GmCHS1b    ITYIGETGE                                             59
           ***   * *
```

图 2 *GmCHS*1 可变剪切位点的核苷酸(A)及推导的氨基酸序列(B)

Fig. 2 Nucleotide (A) and deduced amino acid (B) sequences of the alternative exons of *GmCHS*1

星号标记表示完全一致的核苷酸和氨基酸。Asterisks indicate identical nucleotides or amino acids.

*GmCHS1a* 在梨小食心虫不同发育阶段的表达趋势与 *GmCHS*1 基本一致,表现为在幼虫蜕皮和预蛹-蛹转变过程中高表达(图 7: A)。*GmCHS1b* 在幼虫期表达量较低,直到预蛹第 3 日龄达到最高峰,进入蛹期表达量有所降低,但仍高于幼虫期和成虫期,表现为在预蛹-蛹和蛹-成虫转变过程中高表达(图 7: B)。

## 3 讨论

本研究首次克隆了梨小食心虫 *GmCHS*1 的 cDNA 全长序列,其中包含 4 698 bp 完整的开放阅读框(ORF),编码 1 565 个氨基酸序列,包含 3 个结构域,分别是结构域 A, B 和 C。结构域 A 在几丁质合成酶的 N 端区,由 9 个跨膜螺旋组成;不同昆虫的 CHS 在结构域 A 含有不同数量的跨膜螺旋,保守性较低(余海中等, 2015; 赵文静等, 2016)。结构域 B 编码大约 322 个氨基酸序列,是蛋白质的催化中心,该区域高度保守,包含了几丁质合成酶特有的标签序列 EDR 和 QRRRW(Nagahashi *et al.*, 1995; 张文庆等, 2011)。结构域 C 包含了 7 个跨膜螺旋,拥有 7 个跨膜螺旋是 CHS1 结构域 C 的共同特征,CHS2 因物种不同包含的跨膜螺旋不同(Ampasala*et al.*, 2011)。本研究扩增过程中发现 *GmCHS*1 包含两个可变剪切外显子 *GmCHS1a* 和 *GmCHS1b*,两者存在 177 bp 的差异,编码 59 个氨基酸的差异,氨基酸序列一致性为 70%。目前,昆虫中只在 *CHS*1 中发现了可变剪切外显子,已报道的 *CHS*1 存在可变剪切外显子的昆虫包括亚洲玉米螟、东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis*、赤拟谷盗、烟草天蛾、冈比亚按蚊、黑腹果蝇、小菜蛾、甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* (Zimoch and Merzendorfer, 2002; Arakane *et al.*, 2004; Hogenkamp *et al.*, 2005; Ashfaq *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010; Qu and Yang, 2012)。

根据选取的各种昆虫 CHSs 氨基酸序列构建的系统进化树基本能反映昆虫中 CHS 的进化关系。系统进化分析显示,所选昆虫的 CHS1 聚为一大支,CHS2 聚为另一大支,这预示着 CHS1 在物种进化过程中非常保守,尤其是其催化结合域。本研究得到的 GmCHS1a 和 GmCHS1b 分布于 CHS1 区域,因此可以确定 GmCHS1 属于一类几丁质合成酶。单独分析两个可变剪切外显子的氨基酸序列,GmCHS1a 和其他昆虫CHS1a外显子聚为一支,GmCHS1b则

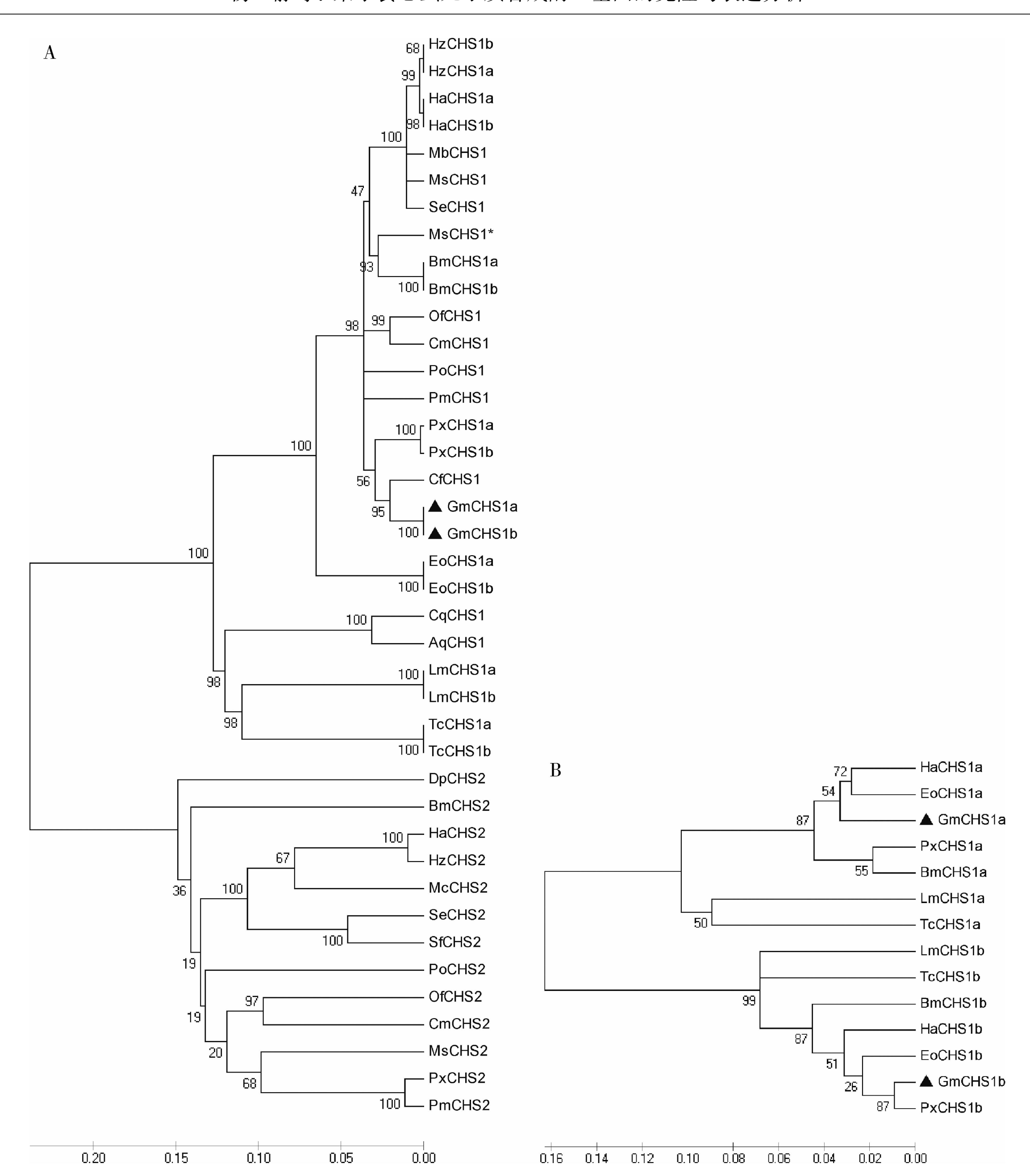



图 3　基于氨基酸序列构建的梨小食心虫 GmCHS1a 和 GmCHS1b 与相关物种 CHS(A)及 GmCHS1a 和 GmCHS1b 可变剪切外显子(B)系统进化树(邻接法)

Fig. 3　Phylogenetic trees based on the amino acid sequences of GmCHS1a and GmCHS1b in *Grapholitha molesta* and CHS of other related insects (A) and alternative exons of GmCHS1a and GmCHS1b (B) by using neighbor-joining method

几丁质合成酶的来源与 GenBank 登录号 Origin of the CHSs and their GenBank accession numbers：梨小食心虫 *Grapholitha molesta*（GmCHS1a：MF000781；GmCHS1b：MF000782）；美洲棉铃虫 *Helicoverpa zea*（HzCHS1a：ADX66428；HzCHS1b：ADX66429；HzCHS2：ADX66427）；棉铃虫 *Helicoverpa armigera*（HaCHS1a：AKR54210；HaCHS1b：AKR54211；HaCHS2：AKZ08595）；甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae*（MbCHS1：ABX56676）；粘虫 *Mythimna separata*（MsCHS1：AOZ56906）；甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*（SeCHS1：AAZ03545；SeCHS2：ABI96087）；烟草天蛾 *Manduca sexta*（MsCHS1*：AAL38051；MsCHS2：AAX20091）；家蚕 *Bombyx mori*（BmCHS1a：XP_012549892；BmCHS1b：XP_012549891；BmCHS2：AFC69002）；亚洲玉米螟 *Ostrinia fumacalis*（OfCHS1：ACF53745；OfCHS2：ABB97082）；稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis*（CmCHS1：AJG44538；CmCHS2：AJG44539）；马铃薯块茎蛾 *Phthorimaea operculella*（PoCHS1：AOE23678；PoCHS2：AIJ50381）；金凤蝶 *Papilio machaon*（PmCHS1：KPJ06518；PmCHS2：KPJ06520）；小菜蛾 *Plutella xylostella*（PxCHS1a：API61827；PxCHS1b：API61827）；云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana*（CfCHS1：ACD84882）；茶尺蠖 *Ectropis obliqua*（EoCHS1a：ACA50098；EoCHS1b：ACD10533）；致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus*（CqCHS1：XP_001866798）；四斑按蚊 *Anopheles quadrimaculatus*（AqCHS1：ABD74441）；东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis*（LmCHS1a：ACY38588；LmCHS1b：ACY38589）；赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*（TcCHS1a：XP_008194188；TcCHS1b：NP_001034491）；帝王蝶 *Danaus plexippus*（DpCHS2：EHJ63544）；蓓带夜蛾 *Mamestra configurata*（McCHS2：AJF93428）；草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda*（SfCHS2：AAS12599）；柑橘凤蝶 *Papilio xuthus*（PxCHS2：KPI93759）. 节点处的数字为 1 000 次自展后超过 50% 的自展值。Bootstrap support values (>50) of NJ tree (1 000 replicates) are indicated besides nodes.

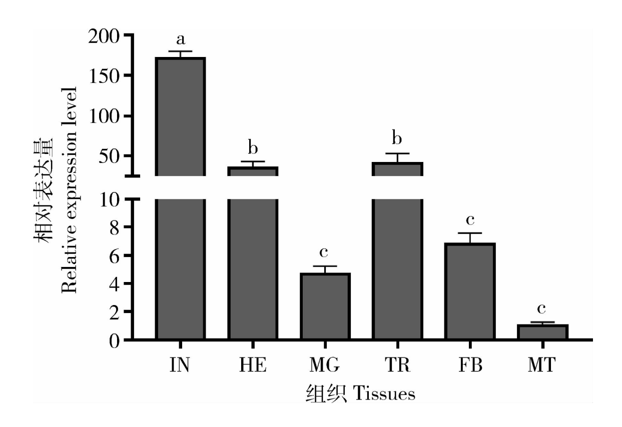



图 4 *GmCHS*1 在梨小食心虫 1 日龄预蛹不同组织中的相对表达量

Fig. 4 Relative expression level of *GmCHS*1 in different tissues of 1 day-old prepupae of *Grapholitha molesta*

IN：体壁 Integument；HE：头部 Head；MG：中肠 Midgut；TR：气管 Trachea；FB：脂肪体 Fat body；MT：马氏管 Malpighian tubules. 柱上不同的字母代表基因表达差异显著（$P<0.05$，Tukey 氏多重比较法；n=3）。Different letters on the bars of the histogram indicate statistically significant difference（$P<0.05$，Tukey's range test；n=3）.

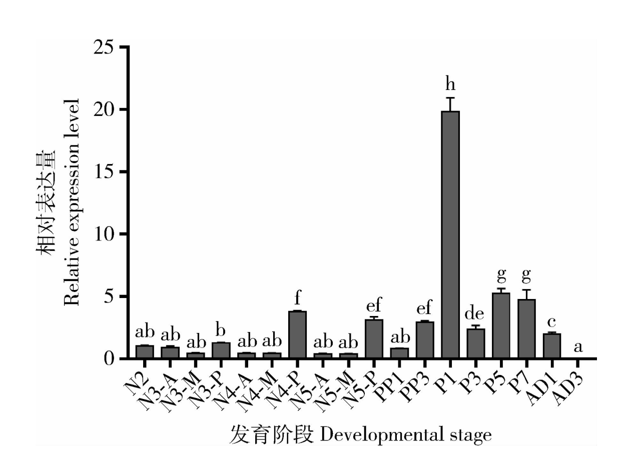



图 5 *GmCHS*1 在梨小食心虫不同发育阶段的相对表达量

Fig. 5 Relative expression level of *GmCHS*1 in different developmental stages in the whole body of *Grapholitha molesta*

N2：2 龄幼虫 2nd instar larvae；N3-A：3 龄前期幼虫 Anterior stage of the 3rd instar larvae；N3-M：3 龄中期幼虫 Median stage of the 3rd instar larvae；N3-P：3 龄后期幼虫 Posterior stage of the3rd instar larvae；N4-A：4 龄前期幼虫 Anterior stage of the 4th instar larvae；N4-M：4 龄中期幼虫 Median stage of the 4th instar larvae；N4-P：4 龄后期幼虫 Posterior stage of the 4th instar larvae；N5-A：5 龄前期幼虫 Anterior stage of the 5th instar larvae；N5-M：5 龄中期幼虫 Median stage of the 5th instar larvae；N5-P：5 龄后期幼虫 Posterior stage of the 5th instar larvae；PP1：1 日龄预蛹 1 day-old prepupae；PP3：3 日龄预蛹 3 day-old prepupae；P1：1 日龄蛹 1 day-old pupae；P3：3 日龄蛹 3 day-old pupae；P5：5 日龄蛹 5 day-old pupae；P7：7 日龄蛹 7 day-old pupae；AD1：1 日龄成虫 1 day-old adults；AD3：3 日龄成虫 3 day-old adults. 柱上不同字母代表基因表达差异显著（$P<0.05$，Tukey 氏多重比较法；n=3）。Different letters above bars of the histogram indicate statistically significant difference（$P<0.05$，Tukey's range test；n=3）.

与其他昆虫 CHS1b 外显子聚为一支，说明这两个基因分别属于 CHS1a 和 CH1b。在 CHS1a 和 CHS1b 两个分支上，同属鳞翅目昆虫的棉铃虫、小菜蛾、茶尺蠖、家蚕、梨小食心虫在同一进化分支上，亲缘关系近，同源性高；鞘翅目赤拟谷盗和东亚飞蝗各自据为一个进化分支，这说明 CHS1a 和 CHS1b 在进化上具有很好的保守性，也显示了不同目昆虫 CHS1a 和 CHS1b 蛋白进化上的差异性。

组织特异性表达分析表明，*GmCHS*1 主要在体壁、头部和气管中表达，在中肠中的表达量远低于体壁中；这种表达特性与其他昆虫中 *CHS*1 的特性相同，包括棉铃虫、亚洲玉米螟、家蚕、甜菜夜蛾和东亚飞蝗（Chen *et al.*, 2007；Zhang *et al.*, 2010；占智高，2010；Qu and Yang, 2012；马龙，2014）。CHS1 主要负责表皮和气管的外壳中几丁质的合成，*GmCHS*1 表达特性与其他昆虫中 *CHS*1 的特征相吻合，说明 *GmCHS*1 在梨小食心虫中也主要负责表皮和气管中几丁质的合成。

进一步通过基因在不同发育阶段表达分析结果可以看出，*GmCHS*1 在梨小食心虫发育各个阶段均有表达，说明该基因对于梨小食心虫各个阶段的发育是必需的。在每个阶段 *GmCHS*1 的表达水平随着昆虫的变态发育表现出周期性的变化，主要在蜕皮过程和蛹形成前期高表达，在进食期表达量很低。*GmCHS*1 表达量的高峰期正是幼虫新表皮和蛹壳形成的阶段，表明该基因的功能与幼虫表皮和蛹壳的几丁质合成密切相关。这一结果与之前报道的多种鳞翅目昆虫 *CHS*1 基因在不同发育阶段的表达水平（Chen *et al.*, 2007；占智高，2010；Qu and Yang, 2012；马龙，2014）大致相同。

目前对于 CHS1 可变外显子的研究表明 CHS1a 和 CHS1b 具有不同的功能，CHS1a 主要负责表皮几丁质的合成，CHS1b 参与气管中几丁质的合成，且在不同的发育阶段发挥着作用。对褐飞虱 *NlCHS*1 的研究表明，*NlCHS1a* 主要是在体壁中表达，而 *NlCHS1b* 主要是在气管中表达，且两者在中肠痕量表达。*NlCHS1a* 一般是在蜕皮后表达量会明显上升，*NlCHS1b* 仅是在蜕皮前的 1－2 d 表达量会升高，但总体表达量明显低于 *NlCHS1a*；作者推测这种不同时间的差异可能是因为气管几丁质的合成要先

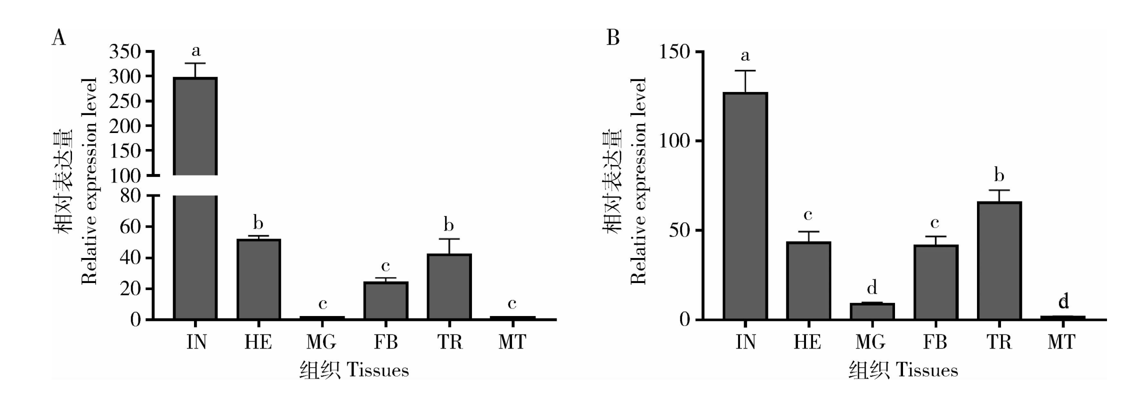



图 6　*GmCHS1a*(A)和 *GmCHS1b*(B)在梨小食心虫 1 日龄预蛹不同组织中的相对表达量

Fig. 6　Relative expression levels of *GmCHS1a* (A) and *GmCHS1b* (B) in different tissues of 1 day-old prepupae of *Grapholitha molesta*

IN：体壁 Integument；HE：头部 Head；MG：中肠 Midgut；TR：气管 Trachea；FB：脂肪体 Fat body；MT：马氏管 Malpighian tubules. 柱上不同字母代表基因表达差异显著($P < 0.05$，Tukey 氏多重比较法；n = 3)。Different letters above bars of the histogram indicate statistically significant difference ($P < 0.05$, Tukey's range test; n = 3).

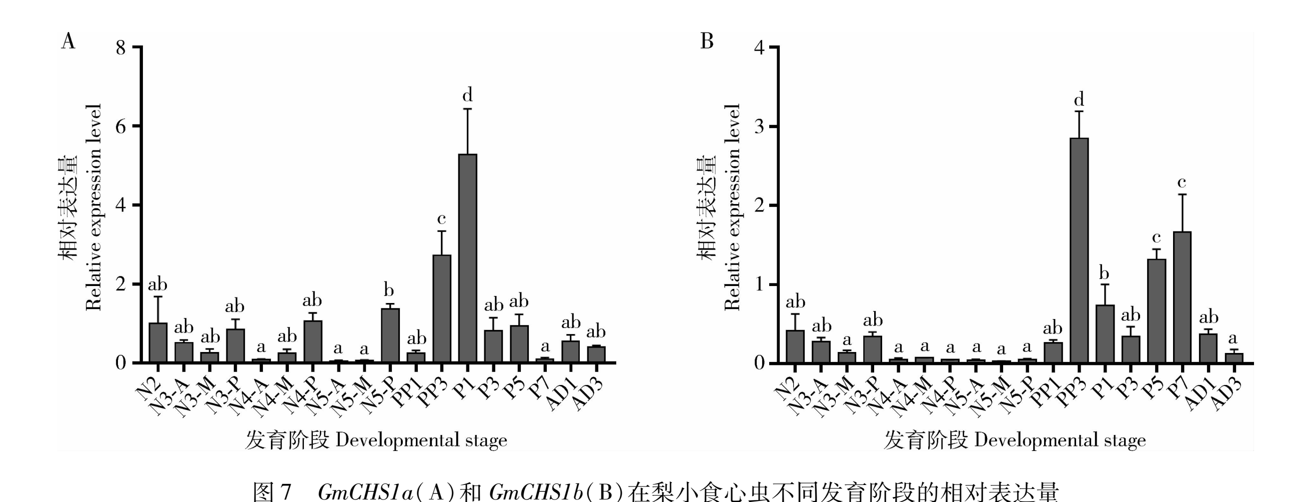



图 7　*GmCHS1a*(A)和 *GmCHS1b*(B)在梨小食心虫不同发育阶段的相对表达量

Fig. 7　Relative expression levels of *GmCHS1a* (A) and *GmCHS1b* (B) in different developmental stages in the whole body of *Grapholitha molesta*

N2：2 龄幼虫 2nd instar larvae；N3-A：3 龄前期幼虫 Anterior stage of 3rd instar larvae；N3-M：3 龄中期幼虫 Median stage of 3rd instar larvae；N3-P：3 龄后期幼虫 Posterior stage of 3rd instar larvae；N4-A：4 龄前期幼虫 Anterior stage of 4th instar larvae；N4-M：4 龄中期幼虫 Median stage of 4th instar larvae；N4-P：4 龄后期幼虫 Posterior stage of 4th instar larvae；N5-A：5 龄前期幼虫 Anterior stage of 5th instar larvae；N5-M：5 龄中期幼虫 Median stage of 5th instar larvae；N5-P：5 龄后期幼虫 Posterior stage of 5th instar larvae；PP1：预蛹第 1 日龄 1 day-old prepupae；PP3：预蛹第 3 日龄 3 day-old prepupae；P1：蛹第 1 日龄 1 day-old pupae；P3：蛹第 3 日龄 3 day-old pupae；P5：蛹第 5 日龄 5 day-old pupae；P7：蛹第 7 日龄 7 day-old pupae；AD1：成虫第 1 日龄 1 day-old adults；AD3：成虫第 3 日龄 3 day-old adults. 柱上不同字母代表基因表达差异显著($P < 0.05$，Tukey 氏多重比较；n = 3)。Different letters on the bars of the histogram indicate statistically significant difference ($P < 0.05$, Tukey's range test; n = 3).

于表皮，这种在不同发育阶段的差异表达说明两个可变外显子在功能上是有一定的区别(Wang *et al*., 2012)。亚洲玉米螟 *OfCHS1a* 和 *OfCHS1b* 的组织表达特异性都倾向于在表皮中，在中肠中的表达量很低。*OfCHS1a* 主要在新生成的卵中、幼虫-幼虫蜕皮过程和幼虫-蛹过程表达，*OfCHS1b* 主要在幼虫-幼虫蜕皮过程和蛹-成虫的发育过程中表达，两者在不同的发育阶段发挥这作用，*OfCHS1a* 的功能是参与了幼虫蜕皮和成蛹过程，*OfCHS1b* 则可能与成虫翅脉中的气管形成有关(Qu and Yang, 2012)。本研究中梨小食心虫 *GmCHS*1 的选择剪切产物的表达模式为，*GmCHS1a* 在体壁的表达高于 *GmCHS1b*，而在气管的表达低于 *GmCHS1b*，两者在脂肪体都有少量表达，在中肠几乎不表达。证明与其他昆虫的一样，*GmCHS1a* 参与了表皮的形成，*GmCHS1b* 参与了气管的发育。在不同发育阶段，*GmCHS1a* 表达模式

与 *GmCHS*1 的表达模式基本相同,在幼虫-幼虫和预蛹-蛹的形成过程中表达水平也出现峰值,但是含量比 *GmCHS*1 低,变化也没有 *GmCHS*1 剧烈,说明该基因主要在幼虫蜕皮及蛹的形成过程中发挥作用。*GmCHS1b* 的表达主要特点是在预蛹期及蛹发育为成虫的过程中表达量高,说明其在蛹形成和羽化过程中发挥作用。

本研究通过克隆梨小食心虫几丁质合成酶 1 基因 cDNA 序列及两个可变剪切外显子序列 *GmCHS1a* 和 *GmCHS1b*,并对该序列进行了分析,了解了梨小食心虫几丁质合成酶 1 的结构特征,并对 *GmCHS1a* 和 *GmCHS1b* 在梨小食心虫不同组织和不同发育阶段的表达量进行了分析,为进一步研究几丁质合成酶基因的功能及其对梨小食心虫生长发育的影响奠定了良好基础,也为害虫防治提供了新的思路和方法。

## 参考文献(References)


Ampasala DR, Zheng SC, Zhang DY, Ladd T, Doucet D, Krell PJ, Retnakaran A, Feng QL, 2011. An epidermis-specific chitin synthase cDNA in *Choristoneura fumiferana*: cloning, characterization, developmental and hormonal-regulated expression. *Arch. Insect Biochem.*, 76(2): 83 - 96.

Andersen SO, Højrup P, Roepstorff P, 1995. Insect cuticular proteins. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 25(2): 153 - 176.

Arakane Y, Hogenkamp DG, Zhu YC, Kramer KJ, Specht CA, Beeman RW, Kanost MR, Muthukrishnan S, 2004. Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and alternate exon usage in one of the genes during development. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 34(3): 291 - 304.

Ashfaq M, Sonoda S, Tsumuki H, 2007. Developmental and tissue-specific expression of CHS1 from *Plutella xylostella* and its response to chlorfluazuron. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 89(1): 20 - 30.

Candy DJ, Kilby BA, 1962. Studies on chitin synthesis in the desert locust. *J. Exp. Biol.*, 39(1): 129 - 140.

Chen XF, Yang X, Senthil Kumar N, Tang B, Sun XJ, Qiu XM, Hu J, Zhang WQ, 2007. The class A chitin synthase gene of *Spodoptera exigua*: Molecular cloning and expression patterns. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 37(5): 409 - 417.

Fan RJ, Liu ZF, Lu JJ, Feng YT, Yu Q, Gao Y, Zhang RX, 2013. Progress in the application of IPM to control the oriental fruit moth (*Grapholitha molesta*) in China. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 50(6): 1509 - 1513. [范仁俊, 刘中芳, 陆俊姣, 封云涛, 庾琴, 高越, 张润祥, 2013. 我国梨小食心虫综合防治研究进展. 应用昆虫学报, 50(6): 1509 - 1513]

Gagou ME, Kapsetaki M, Turberg A, Kafetzopoulos D, 2002. Stage-specific expression of the chitin synthase *DmeChSA* and *DmeChSB* genes during the onset of *Drosophila metamorphosis*. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 32(2): 141 - 146.

Hogenkamp DG, Arakane Y, Zimoch L, Merzendorfer H, Kramer KJ, Beeman RW, Kanost MR, Specht CA, Muthukrishnan S, 2005. Chitin synthase genes in *Manduca sexta*: characterization of a gut-specific transcript and differential tissue expression of alternately spliced mRNAs during development. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 35(6): 529 - 540.

Khajuria C, Buschman LL, Chen MS, Muthukrishnan S, Zhu KY, 2010. A gut-specific chitinase gene essential for regulation of chitin content of peritrophic matrix and growth of *Ostrinia nubilalis* larvae. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 40(8): 621 - 629.

Kirk H, Dorn S, Mazzi D, 2013. Worldwide population genetic structure of the oriental fruit moth (*Grapholita molesta*), a globally invasive pest. *BMC Ecol.*, 13(1): 12.

Kramer KJ, Koga D, 1986. Insect chitin: physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. *Insect Biochem.*, 16(6): 851 - 877.

Lin C, 2010. Cloing of Chitin Synthase (CS) Gene from *Ectropis obliqua* and Recombination of Baculovirus with CS dsRNAi Gene. PhD Dissertation, Zhejiang University, Hangzhou. [林晨, 2010. 茶尺蠖几丁质合成酶基因克隆及其双链干涉重组病毒毒力研究. 杭州: 浙江大学博士学位论文]

Lu JL, Lin C, Yang XL, Zheng XQ, Liang YR, 2008. Characteristics prediction of insect chitin synthase. *J. Zhejiang Univ.* (*Agric. Life Sci.*), 34(5): 491 - 501. [陆建良, 林晨, 杨晓丽, 郑新强, 梁月荣, 2008. 昆虫几丁质合成酶特性预测. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 34(5): 491 - 501]

Ma L, 2014. Characterization of Genes Related to Chitin Biosynthesis and Influence of Insect Growth Regulations on Genes in Cotton Bollworm *Helicoverpa armigera*. MSc Thesis, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi. [马龙, 2014. 棉铃虫几丁质合成相关基因特性及昆虫生长调节剂对其影响研究. 陕西杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文]

Merzendorfer H, 2006. Insect chitin synthases: a review. *J. Comp. Physiol. B*, 176(1): 1 - 15.

Merzendorfer H, Zimoch L, 2004. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J. Exp. Biol.*, 206(Pt 24): 4393 - 4412.

Nagahashi S, Sudoh M, Ono N, Sawada R, Yamaguchi E, Uchida Y, Mio T, Takagi M, Arisawa M, Yamada-Okabe H, 1995. Characterization of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. Implication of two highly conserved domains as possible catalytic sites. *J. Biol. Chem.*, 270(23): 13961 - 13967.

Qu MB, Yang Q, 2012. Physiological significance of alternatively spliced exon combinations of the single-copy gene class A chitin synthase in the insect *Ostrinia fumacalis* (Lepidoptera). *Insect Mol. Biol.*, 21(4): 395 - 404.

Wang F, Yu Q, Guo GM, Hao C, Fan RJ, 2016. Determination of larval instar number and duration of the *Grapholitha molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Chin. J. Appl. Entomol.*, 53(2): 390 - 395. [王芳, 庾琴, 郭贵明, 郝赤, 范仁俊, 2016. 梨小食心虫幼虫龄数和龄期的划分. 应用昆虫学报, 53(2): 390 - 395]

Wang Y, Fan HW, Huang HJ, Xue J, Wu WJ, Bao YY, Xu HJ, Zhu ZR, Cheng JA, Zhang CX, 2012. Chitin synthase 1 gene and its two alternative splicing variants from two sap-sucking insects, *Nilaparvata lugens* and *Laodelphax striatellus* (Hemiptera: Delphacidae). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 42(9): 637–646.

Wang YR, Huang M, Liu XW, Wu JX, Zhao D, 2011. The study on artificial diet of the oriental fruit moth (*Grapholitha molesta*). *J. Northwest A&F Univ.* (*Nat. Sci. Ed.*), 39(5): 161–166. [王艳蓉, 黄敏, 刘喜旺, 仵均祥, 赵栋, 2011. 梨小食心虫人工饲料的研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 39(5): 161–166]

Wei SJ, Cao LJ, Gong YJ, Shi BC, Wang S, Zhang F, Guo XJ, Wang YM, Chen XX, 2015. Population genetic structure and approximate Bayesian computation analyses reveal the southern origin and northward dispersal of the oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) in its native range. *Mol. Ecol.*, 24(16): 4094–4111.

Yang J, Liu ZF, Fan JQ, Wu YP, Ma RY, Fan RJ, 2016. Genetic variation and population structure of the oriental fruit moth *Grapholita molesta* in Shanxi, a major pome fruits growing region in North China, *J. Asia-Pac. Entomol.*, 19(4): 1131–1137.

Yu HZ, Huang KH, Wang WL, Liu MH, Yang Xin, Zhang Y, Xu JP, 2015. Identification and expression analysis of chitin synthase and related enzymes in the chitin biosynthetic pathway genes of *Cnaphalocrocis medinalis*. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 52(5): 1181–1194. [余海中, 黄克慧, 汪婉玲, 刘明辉, 杨鑫, 张彦, 徐家萍, 2015. 稻纵卷叶螟几丁质合成酶及合成通路相关酶基因的鉴定及表达分析. 应用昆虫学报, 52(5): 1181–1194]

Zhan ZG, 2010. Cloning and Expression Analysis of Epithelial Chitin Synthase Gene in *Bombyx mori*. MSc Thesis, Southwest University, Chongqing. [占智高, 2010. 家蚕表皮型几丁质合成酶基因的克隆及表达分析. 重庆: 西南大学硕士学位论文]

Zhang JZ, Liu XJ, Zhang JQ, Li DQ, Sun Y, Guo YP, Ma EB, Zhu KY, 2010. Silencing of two alternative splicing-derived mRNA variants of chitin synthase 1 gene by RNAi is lethal to the oriental migratory locust, *Locusta migratoria manilensis* (Meyen). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 40(11): 824–833.

Zhang WQ, Chen XF, Tang B, Tian HG, Chen J, Yao Q, 2011. Insect chitin biosynthesis and its regulation. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 48(3): 475–479. [张文庆, 陈晓菲, 唐斌, 田宏刚, 陈洁, 姚琼, 2011. 昆虫几丁质合成及其调控研究前沿. 应用昆虫学报, 48(3): 475–479]

Zhao WJ, Zhang CL, Zhai SZ, Sun Q, Zhang J, 2016. Expression and analysis of chitin synthase gene *CqCHS1* and *CqCHS2* in *Culex quinquefasciatus*. *Genom. Appl. Biol.*, 35(9): 2317–2323. [赵文静, 张春林, 翟素珍, 孙谦, 张晶, 2016. 致倦库蚊几丁质合成酶基因 *CqCHS1* 和 *CqCHS2* 的表达与分析. 基因组学与应用生物学, 35(9): 2317–2323.]

Zheng Y, Peng X, Liu GM, Pan HY, Dorn S, Chen MH, 2013. High genetic diversity and structures populations of the oriental fruit moth in its range of origin. *PLoS ONE*, 8(11): e78476.

Zheng Y, Qiao XF, Wang K, Dorn S, Chen MH, 2015. Population genetics affected by pest management using fruit-bagging: a case study with *Grapholita molestain* China. *Entomol. Exp. Appl.*, 156(2): 117–127.

Zimoch L, Merzendorfer H, 2002. Immunolocalization of chitin synthase in the tobacco hornworm. *Cell Tissue Res.*, 308(2): 287–297.

（责任编辑：马丽萍）